

**TRANSFORMASI GENA *SUCROSE-PHOSPHATE SYNTHASE* TEBU
MELALUI *Agrobacterium tumefaciens* PADA TANAMAN PADI
(*Oryza sativa* L.)
TRANSFORMATION OF SUGARCANE *SUCROSE-PHOSPHATE
SYNTHASE* GENE WITH *Agrobacterium tumefaciens*
IN RICE PLANTS (*Oryza sativa* L.)**

Muhammad Hazmi¹, Iskandar¹, dan Bambang Sugiharto²

¹Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Jember

Jalan Karimata 49 Jember 68121

²Fakultas MIPA Universitas Jember

[mhazmi.hazmi@gmail](mailto:mhazmi.hazmi@gmail.com)

ABSTRACT

In this experiment, sugarcane sucrose-phosphate synthase gene (SoSPS1) was transferred by inoculating calli and embryo seeds of Ciberang rice with Agrobacterium tumefaciens LBA4404::pKYS and GV3101::pCLA containing nptII gene as a selectable marker. The results show that there are prospects for the inoculation of infected explants, but construct gene that is transferred is not integrated permanently into the target sequence gene, so the transformant rice shoots has not obtained yet. The results open up opportunities of the study to improve the methods of genetic transformation through A. tumefaciens in rice plants.

Key words : transformation, A. tumefaciens, LBA4404::pKYS, GV3101::pCLA, rice.

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan komoditas tanaman pangan yang penting bagi bangsa Indonesia, karena menjadi sumber bahan makanan pokok sebagian besar rakyat Indonesia. Konsumsi beras rakyat Indonesia menunjukkan kecenderungan terus meningkat. Data dari Badan Ketahanan Pangan (BKP) menunjukkan bahwa konsumsi beras per kapita bangsa

Indonesia adalah 142,7 kg/orang pada tahun 2005 meningkat menjadi 154,1 kg/orang pada tahun 2008 (Putranto, 2010). Peningkatan konsumsi beras per kapita yang disertai dengan pertambahan jumlah penduduk semakin meningkatkan permintaan ketersediaan cadangan beras nasional. Suplai beras dari produksi dalam negeri belum mampu secara stabil memenuhi kebutuhan beras nasional. Penyebabnya

antara lain adalah luas lahan semakin menyusut dengan tingkat kesuburan tanah yang semakin menurun, produktivitas tanaman yang masih rendah, dan perubahan musim yang menyimpang. Kondisi tersebut selalu menjadi ancaman kelangsungan swasembada beras. Oleh karena itu, peningkatan produksi beras dalam negeri menjadi prioritas dalam pertanian tanaman pangan, terutama melalui peningkatan produktivitas tanaman.

Perkembangan bioteknologi tanaman, khususnya melalui biologi molekul menawarkan penerapan transformasi genetik pada tanaman padi. Penelitian mengenai manipulasi genetik padi di Indonesia dimulai sejak tahun 1995 (Rahmawati, 2006). Transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada padi indika dan javanika dirintis sejak tahun 1996 (Slamet-Loedin *dkk.*, 1997). Gena *rhLF* (*lactoferrin*) manusia telah berhasil ditransformasikan ke padi kultivar rojolele melalui *A. tumefaciens* dengan promoter *ubiquitin* jagung (Rachmawati

et al., 2004). Gena ketahanan PBK (*cryIIb-cryIAa hybrid*) dari Bt telah ditransformasikan ke padi rojolele melalui *A. tumefaciens* dengan promoter *ubiquitin* jagung (Rahmawati dan Slamet-Loedin, 2004). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa transformasi genetik yang dilakukan oleh para peneliti merupakan upaya optimalisasi hasil potensial tanaman padi. Oleh karena itu perlu diteliti penerapan transformasi genetik untuk mentransfer gena penyandi protein yang dapat meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman, sehingga dapat meningkatkan produktivitas padi.

Enzima *sucrose phosphate synthase* (*SPS*) merupakan enzima katalisator pembentuk sukrosa pada tanaman. Sukrosa dalam tanaman mempunyai fungsi menyediakan energi dan merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Fung *et al.*, 2003). Sugiharto *et al.* (1997) berhasil mengisolasi dua gena penyandi *SPS* dari tanaman tebu (*SoSPS*). Gena *SoSPS1* mengkode *SPS* yang terdapat pada jaringan fotosintetik, sedangkan gena

SoSPS2 mengkode *SPS* yang diekspresikan secara konstitutif. Gena *SoSPS1* yang ditransfer ke tanaman tebu dengan menggunakan *A. tumefaciens* dapat diekspresikan sampai tingkat translasi sehingga dihasilkan protein *SPS* (Miswar *dkk.*, 2007). Hasil penelitian ini memberikan harapan bahwa gena *SPS* dapat ditransfer ke tanaman monokotil, seperti padi melalui *A. tumefaciens*.

Gena *SoSPS1* selama ini banyak ditransformasikan pada tanaman melalui konstruk plasmid pKYS pada strain *A. tumefaciens* LBA4404 dengan DNA promoter CaMV. Saat ini, gena *SoSPS1* telah dikonstruksi pada plasmid pCL4 yang mengandung DNA promoter *rice ubiquitin* (RUBQ2) dengan strain *A. tumefaciens* GV3101. Strain *A. tumefaciens* GV3101 merupakan strain yang sedang diujicobakan penggunaannya sebagai vektor transformasi pada tanaman monokotil. Transformasi genetik melalui *A. tumefaciens* GV3101::pCL4 berhasil mengekspresikan gena *GUS* pada eksplan pangkal tunas tebu *in vitro*

(Hazmi, 2009). DNA promoter RUBQ2 telah berhasil mengekspresikan gena *GUS* pada eksplan kalus tebu (Liu *et al.*, 2003 dan Sugiharto, 2005). RUBQ2 merupakan DNA promoter yang berasal dari *ubiquitin* padi, sehingga memiliki peluang lebih besar untuk mampu mengekspresikan gena yang dikonstruksi di dalamnya pada kromosom padi dibanding DNA promoter lain.

Transfer gena pada tanaman melalui *A. tumefaciens* banyak digunakan saat ini, karena tekniknya sederhana, biayanya murah, tidak banyak mengubah genom tanaman transforman, dan mampu mentransfer DNA lebih besar. Penerapan metode ini pada tanaman padi masih perlu dikembangkan, karena protokol transformasinya belum *reproducible* (Tyagi *et al.*, 2007), sehingga akurasi hasil transformasi genetiknya rendah (Setyati *dkk.*, 2007). Hal ini mungkin lebih disebabkan oleh padi bukan tanaman inang *A. tumefaciens*, sehingga berbagai komponen transformasi genetik, seperti eksplan, strain *A.*

tumefaciens, plasmid, DNA Promoter, dan media kultur perlu diperbaiki untuk meningkatkan akurasi hasil transformasi. Tulisan ini melaporkan hasil penelitian pendahuluan Transformasi gen *SoSPS1* melalui *A. tumefaciens* pada tanam padi.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 10 bulan pada tahun 2010 di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Jember dan Laboratorium Biologi Molekuler Biologi Dasar FMIPA Universitas Jember.

Bahan Tanaman

Eksplan transformasi adalah kalus dari embrio padi dan embrio padi Ciherang. Biji padi dikelupas palea dan lemmanya, disterilisasikan dengan alkohol 70% selama 1 menit, kemudian dengan sodium hipoklorit 2% selama 15 menit di dalam Shaker. Biji padi kemudian dicuci 4 kali dengan aquabidest, 1 kali pertama dishaker 10 menit. Biji padi dikeringkan di atas

kertas saring steril dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC) selama 20 menit, kemudian ditanam pada media MS dengan 2,4-D 3 mg/l, kinetin 0,3 mg/l, sukrosa 30 g/l, pH 5,7, pematat agar 10 g/l diinkubasi sampai terbentuknya kalus sebagai eksplan transformasi. Eksplan embrio padi diperoleh dari biji padi yang diinkubasi pada media yang sama selama 14 hari sebelum diinfeksi dengan *A. tumefaciens*.

Persiapan *A. tumefaciens*

Strain *A. tumefaciens* LBA440::pKYS dan GV3101::pCL4 yang mengandung konstruk gen *SoSPS1* digunakan sebagai vektor transformasi. Koloni tunggal *A. tumefaciens* LBA440::pKYS ditumbuhkan pada 5 ml media *yeast extract* dan *peptone* (YEP) cair (Sambrook *et al.*, 1989) yang mengandung 50 ppm kanamisin, 50 ppm gentamisin, dan 100 ppm rifamisin, sedangkan satu koloni *A. tumefaciens* GV3101::pCL4 ditumbuhkan pada media 5 ml YEP cair yang mengandung 50 ppm rifamisin dan 50 ppm kanamisin sebagai larutan

starter. Larutan starter diinkubasi sekitar 24 jam yang diletakkan di dalam shaker inkubator dengan kecepatan putaran 85 rpm pada suhu 28°C. Larutan starter sebanyak 1 ml dikultur di dalam media YEP cair 50 ml dengan antibiotik sesuai dengan gena ketahanan dari setiap strain *A. tumefaciens*, kemudian diinkubasi di dalam shaker dengan kecepatan putaran 85 rpm pada suhu 28°C sekitar 8 jam. *A. tumefaciens* dipanen, terlebih dahulu diukur kerapatan optik (OD_{600}) bakterinya dengan spektrofotometer, dituang ke dalam tube 50 ml, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Larutan media YEP dibuang dan pelet dilarutkan ke dalam media MS cair ditambah 100 ppm asetosiringon sebagai media inokulasi

Inokulasi dan Kokultivasi

Kalus atau embrio padi diinokulasi melalui perendaman ke dalam media MS cair yang mengandung *A. tumefaciens* ($OD_{600}=1$) dan 100 ppm asetosiringon selama 15 menit di dalam shaker dengan kecepatan putaran 85

rpm pada suhu 28°C. Eksplan yang telah diinokulasi disaring, lalu dikering anginkan di dalam LAFC sekitar 20 menit, kemudian dikultur pada media MS padat dengan 2,4-D 3 mg/l, kinetin 0,3 mg/l, sukrosa 30 g/l, 100 ppm asetosiringon, pH 5,7, dan pematat agar 10 g/l dikokultivasi di dalam gelap selama 3 hari pada suhu 28°C.

Eliminasi *A. tumefaciens* dan Skrining Eksplan Putatif Transforman

Eksplan hasil kokultivasi dicuci 3 kali dengan media MS cair yang mengandung 500 ppm sefotaksim, dikering anginkan di dalam LAFC. Eksplan dikultur pada media MS padat yang mengandung 500 ppm sefotaksim, BA 3 mg/l, kinetin 0,3 mg/l, sukrosa 30 g/l, pH 5,7, dan pematat agar 10 g/l selama satu minggu untuk mengeliminasi *A. tumefaciens*. Setelah satu minggu, eksplan disubkultur ke media MS yang mengandung kinetin 0,3 mg/l, BA 3 mg/l, sukrosa 30 g/l, 50 ppm kanamisin, pH 5,7, pematat agar 10 g/l untuk seleksi antibiotika. Seleksi antibiotika dilaksanakan selama 3 siklus,

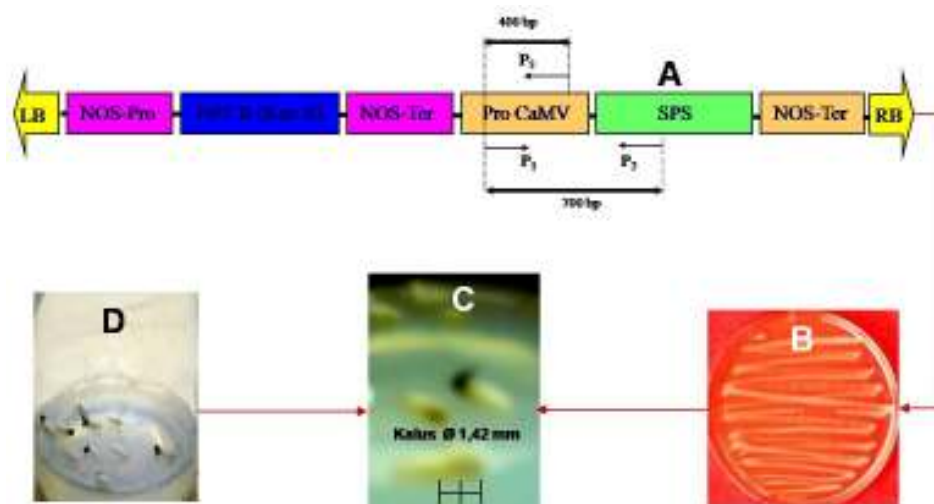
setiap siklus selama 14 hari, dan penyinaran selama 16 jam sehari dengan intensitas 2000 lux.

HASIL DAN PEMBAHASAN

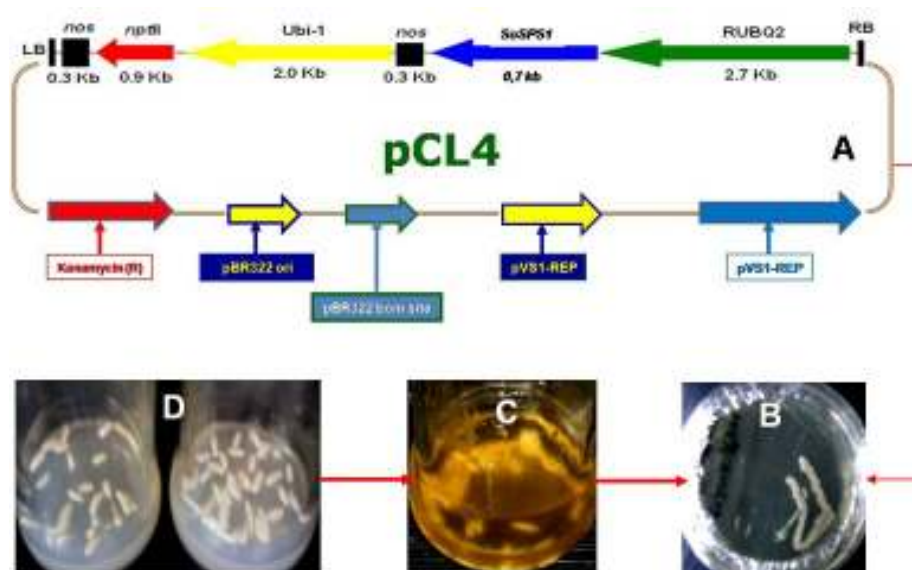
Hasil

Hasil transformasi gena *SoSPS1* yang dikonstruksi pada *A. tumefaciens* LBA4404::pKYS (Gambar 1) dan *A. tumefaciens* GV3101::pCL4 (Gambar 2) pada padi Ciherang disajikan pada Tabel 1. Pertumbuhan eksplan setelah diinokulasi melalui kedua macam plamid sampai dengan siklus 1 seleksi antibiotika (S1) relatif sama, meskipun

diakhir S1 mulai berbeda. Eksplan mulai bertunas di akhir fase eliminasi *A. tumefaciens* dan tumbuh pesat pada minggu pertama S1. Perbedaan pertumbuhan eksplan lebih nyata setelah memasuki minggu pertama siklus 2 seleksi antibiotika (S2). Sejumlah eksplan terlihat mengalami pencoklatan dan mati, sehingga jumlah eksplan yang tumbuh pada akhir S2 menjadi berkurang. Tunas yang masih hidup diakhir S2 mengalami nekrosis dan akhirnya mati pada siklus 3 seleksi antibiotika (S3).



Gambar 1. Transformasi gena *SoSPS1* pada padi varietas Ciherang. A. Konstruksi gena *SoSPS1* pada plasmid pKYS. B. *A. tumefaciens* LBA4404::pKYS dengan OD infeksi 1. C. Inokulasi eksplan kalus padi Ciherang. D. Biji padi sebagai sumber eksplan.



Gambar 2. Transformasi gena *SoSPS1* pada padi varietas Ciherang. A. Konstruksi gena *SoSPS1* pada plasmid pCL4, B. *A. tumefaciens* GV3101::pCL4 dengan OD infeksi 1. C. Inokulasi eksplan embrio padi Ciherang. D. Biji padi sebagai sumber eksplan.

Tabel 1. Hasil transformasi gena *SoSPS1* melalui *A. tumefaciens* LBA4404::pKYS dan GV3101::pCL4 pada tanaman padi Ciherang.

Konstruksi plasmid	Eksplan Inokulasi		Jumlah eksplan hidup				
			Kokultivasi	Eliminasi	Seleksi antibiotika		
	Jenis	Jumlah			S1	S2	S3
LBA4404::pKYS	Kalus	20	20	20	20	11	0
	Embrio	20	20	20	20	14	0
GV3101::pCL4	Kalus	20	20	20	20	13	0
	Embrio	20	20	20	20	17	0

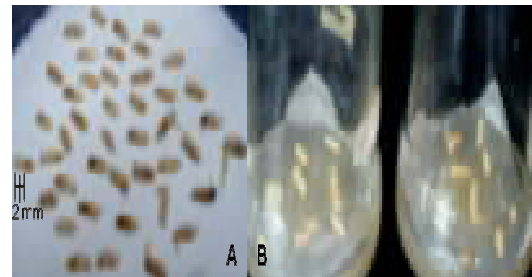
Keterangan: S adalah siklus seleksi antibiotika, setiap siklus lamanya 2 minggu.

Eksplan kalus mulai menginisiasi tunas lebih cepat dari embrio biji padi. Kalus mulai bertunas pada hari ke 7 setelah inokulasi atau pada masa pertengahan fase eliminasi *A. tumefaciens*. Tunas tumbuh segar selama S1 (Gambar 3), tetapi mulai mengalami nekrosis pada pertengahan S2. Tunas hasil infeksi melalui kedua plasmid pada kalus yang mengalami nekrosis tersebut akhirnya mati pada S3.



Gambar 3. Tunas hasil transformasi gena *SoSPS1* melalui *A. tumefaciens* pada eksplan kalus padi Ciherang. A. Kultur kalus sebagai eksplan transformasi. B. Kultur tunas dari eksplan kalus pada media seleksi antibiotika siklus 2.

Eksplan embrio biji padi mulai menginisiasi tunas lebih lambat dari kalus, yaitu pada masa akhir S1. Tunas tersebut mengalami pertumbuhan sampai minggu pertama S2. Sejumlah tunas mulai mengalami nekrosis dan sebagian mati pada minggu terakhir S2. Tunas yang masih hidup mengalami pertumbuhan yang semakin menurun, karena nekrosis menjalar dari ujung tunas menuju ke pangkal tunas dan akhirnya mati pada minggu pertama S3.



Gambar 4. Tunas hasil transformasi gena *SoSPS1* melalui *A. tumefaciens* pada eksplan embrio biji padi. A. Eksplan embrio biji padi setelah fase eliminasi *A. tumefaciens*. B. Pertumbuhan eksplan pada minggu pertama S1.

Pembahasan

Eksplan kalus menginisiasi tunas lebih awal dari embrio padi setelah ditransformasi gena *SoSPS1* melalui *A. tumefaciens*. Hal ini mungkin disebabkan oleh eksplan kalus telah mengalami pertumbuhan 2 sampai dengan 4 minggu lebih awal dari embrio padi, yakni masa pembuatan eksplan kalus sebagai persiapan pelaksanaan transformasi genetik. Pertumbuhan tunas dari eksplan kalus juga lebih cepat, khususnya selama masa S1, meskipun pada masa S2 mengalami nekrosis dan akhirnya mati. Eksplan kalus dari sisi teknis persiapan eksplan transformasi genetik menimbulkan banyak kesulitan. Embrio biji padi sebagai eksplan inisiasi kalus memiliki tingkat pengkalusan yang rendah dengan rerata persentase pembentukan kalus sekitar 40% dari jumlah embrio biji yang dikaluskan dan waktu inisiasi kalus tidak bersamaan. Keadaan ini sejalan dengan hasil penelitian Islam *et al.* (2004) dan Islam *et al.* (2005), bahwa inisiasi kalus dari embrio biji padi memiliki beberapa faktor pembatas, seperti varietas padi dan kandungan media kultur. Lamanya waktu pengkalusan juga menyebabkan sebagian besar kalus mengering dan mati, sehingga gagal menginisiasi tunas (Nazim-Ud-Dowla, *et al.*, 2008). Hal ini menimbulkan kesulitan untuk mendapatkan jumlah kalus yang banyak pada waktu yang sama, sehingga menghambat kontinuitas reproduksi kalus padi sebagai eksplan transformasi genetik. Selain itu, kandungan media pengkalusan yang sama, tetapi dibuat pada waktu yang berbeda, sering menghasilkan respons pengkalusan embrio biji padi yang berbeda. Penyebab keberhasilan pengkalusan yang tidak konsisten ini secara pasti belum diketahui. Kesulitan ini menimbulkan gagasan untuk melakukan penelitian perbaikan pengkalusan padi, agar akurasi inisiasi kalus lebih tinggi, sehingga eksplan untuk transformasi genetik tersedia dalam jumlah banyak pada waktu yang sama. Kemampuan eksplan menginisiasi kalus dalam jumlah banyak pada waktu yang sama sangat

diperlukan untuk menunjang keberhasilan pelaksanaan transformasi genetik pada tanaman padi (Evangelista *et al.*, 2009).

Gagasan lain yang langsung diterapkan dalam penelitian ini adalah penggunaan embrio biji padi sebagai eksplan transformasi gena *SoSPS1*. Penggunaan embrio biji padi dapat mengatasi masalah ketersediaan eksplan transformasi genetik. Embrio biji padi mudah disediakan dalam jumlah banyak pada waktu yang sama, sehingga kegiatan transformasi genetik dapat dilaksanakan setiap diperlukan.

Transformasi gena *SoSPS1* yang dikonstruksi pada *A. tumefaciens* LBA4404::pKYS pada eksplan kalus dan embrio biji padi belum mampu menghasilkan tunas yang berhasil tumbuh melewati seleksi antibiotika S3. Hal ini menunjukkan bahwa tunas yang dihasilkan tidak transforman. Oleh karena itu muncul gagasan untuk menggunakan strain *A. tumefaciens* dan plasmid lain sebagai vektor transformasi gena *SoSPS1*. Transformasi gena *SoSPS1* selanjutnya dilaksanakan

melalui *A. tumefaciens* GV3101::pCL4 pada eksplan kalus dan embrio biji padi, tetapi belum mampu menghasilkan tunas padi transforman. Gena ketahanan terhadap antibiotika kanamisin tidak terintegrasi ke dalam kromosom tunas padi, sehingga tidak berfungsi dalam mengadaptasikan tunas terhadap kondisi media kultur yang mengandung antibiotika.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Secara keseluruhan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ada prospek eksplan yang diinokulasi terinfeksi. Konstruksi gena *SoSPS1* belum terintegrasi secara permanen ke dalam genom eksplan tanaman padi, sehingga belum diperoleh tunas padi transforman. Hal ini mungkin disebabkan oleh padi bukan tanaman inang *A. tumefaciens*, sehingga berbagai komponen transformasi genetik, seperti eksplan, strain *A. tumefaciens*, plasmid, DNA Promoter, dan media kultur perlu diperbaiki agar *compatible*.

Saran

Hasil penelitian ini membuka peluang untuk dilakukannya kajian perbaikan metode transformasi gen *SoSPS1* melalui *A. tumefaciens* pada tanaman padi. Oleh karena itu transformasi gen *SoSPS1* melalui *A. tumefaciens* perlu diteliti lebih lanjut agar berguna untuk meningkatkan produktivitas tanaman padi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti menyampaikan terima kasih kepada DP2M DIRJEN DIKTI DEPDIKNAS RI yang telah membiayai penelitian ini dan Laboratorium Biologi Molekular Biologi Dasar FMIPA Universitas Jember yang telah memperkenalkan peneliti menggunakan fasilitas yang diperlukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Evangelista F.C., R.R. Aldemita, and L.B. Ungson, 2009. Callusing and regeneration potential of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes towards the development for salt tolerance. *Philippine Journal of Science* 138 (2): 169-176.
- Fung R.W.M., Langenkamper G., Gardner R.C., dan MacRae E., 2003. Differential expression within an SPS gene family. *Plant Sci.* 164: 459-470.
- Hazmi M., 2009. Pengembangan Metode Transformasi Melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada Eksplan Pangkal Tunas Tebu *In Vitro*. Disertasi – PDIP Universitas Brawijaya, Malang.
- Islam M.M., S. A. Wahed and S. A. K. U. Khan, 2004. Studies on callus induction and regeneration from dehusked rice (*Oryza sativa* L.) Seeds. *Plant Tissue Cult.* 14 (2): 155-160.
- Islam M.M., M. Ahmed and D. Mahaldar, 2005. *In vitro* callus induction and plant regeneration in seed explants of rice (*Oryza Sativa* L.). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1(1): 72-75.
- Liu D., S.V. Oard, and J.H. Oard, 2003. High transgene expression levels in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2. *Plant Science* 165: 743-750.
- Miswar, B. Sugiharto, J. Soedarsono, dan S. Moeljapawiro, 2007. Transformasi gen *Sucrose-Phosphate Synthase (SoSPS1)* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* untuk meningkatkan sistensi sukrosa tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Berk. Penel. Hayati* 12: 137-143.

- Nazim-Ud-Dowla M.A.N., N.U. Ahmed, and L. Hassan, 2008. Optimization of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *indica* rice. *Thai Journal of Agricultural Science* 41(3-4): 127-133.
- Putranto W., 2010. Cukupkah beras Indonesia? Biro Pusat Statistik (BPS) - Direktorat Analisis dan Pengembangan Statistik (DAPS).
- Rachmawati, D., T. Mori, T. Hosaka, F. Takaiwa, E. Inoue, and H. Anzai. 2004. Production and characterization of recombinant human lactoferrin in transgenic Javanica rice cv Rojolele. 4th International Crop Science Congress.
- Rahmawati, S. dan I.H. Slamet-Loedin. 2004. Konstruksi vektor biner mengandung gen hybrid *cryI/B-cryIIAa* untuk transformasi *Agrobacterium* tanaman padi. *Biota* 9: 67-73.
- Rahmawati S., 2006. Status perkembangan perbaikan sifat genetik padi menggunakan transformasi *Agrobacterium*. *Jurnal Agrobiogen* 2(1): 36-44.
- Sambrook, J., E-F. Fritsh and T. Maniatis 1969. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. America.
- Setyati S., P. Oktaviandari, M. Hazmi, dan B. Sugiharto, 2007. Studi perbandingan metode transformasi dna menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman tebu (*Sacharum hybrid*). *Berk. Penel. Hayati* 13: 39-44.
- Slamet-Loedin, I H, W. Rahayu, S Hutajulu. dan J. Wibowo, 1997. Penggunaan dua strain *Agrobacterium tumefaciens* supervirulen untuk ko-kultivasi tanaman padi kultivar Cisadane dan Rojolele. Prosiding Seminar Perhimpunan Bioteknologi Indonesia. Surabaya, 12-14 Maret 1997. hlm. 140-148.
- Sugiharto B., 2005. Development of an efficient *Agrobacterium*-mediated transformation method for sugarcane. JIRCAS.
- Sugiharto B., Sakakibara H., Sumadi, and Sugiyama T, 1997. Differential expression of two genes for sucrose phosphate synthase in sugar cane: Molecular cloning of the cDNAs and comparative analysis of gene expression. *Plant Cell Physiol.* 38: 961-965.
- Tyagi H., S. Rajasubramaniam, and I. Dasgupta, 2007. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of a popular *indica* rice variety, ADT39. *Current Science* 93 (5): 678-683.